

PENGARUH PENAMBAHAN MEDIUM PROVASSOLI'S ENRICHED SEAWATER (PES) TERHADAP KADAR KOLIN YANG DIHASILKAN MAKROALGA COKLAT *Sargassum* sp.

EFFECT OF PROVASSOLI'S ENRICHED SEAWATER (PES) MEDIUM TO CHOLINE CONTENT PRODUCED BY BROWN MACROALGAE *Sargassum* sp.

Cohen Mc Amos, B. Boy Rahardjo S., F. Sinung Pranata.
Fakultas Teknobiologi, Universitas Atma Jaya Yogyakarta, Jalan Babarsari 44,
Yogyakarta.

Abstrak

Kolin merupakan salah satu senyawa yang dibutuhkan dalam dunia farmasetika sebagai bahan baku dalam pembuatan obat untuk nutrisi otak maupun bahan tambahan dalam pembuatan susu formula. Senyawa kolin memiliki aktivitas yang dapat digunakan untuk membantu mengembangkan otak dan daya ingat. Saat ini senyawa ini sedang banyak digunakan dalam bidang kedokteran untuk membantu penderita *alzheimer*, *parkinson*, dan *myasthenia gravis*. Di Indonesia rumput laut coklat sebagai sumberdaya potensial yang banyak tumbuh secara alami di perairan Indonesia adalah jenis *Sargassum* dan *Turbinaria*. *Sargassum* sp memiliki kemampuan dalam menghasilkan senyawa kolin dan beberapa senyawa aktif lainnya. Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh pemberian medium *Provasoli of Enriched Seawater* (PES) dengan variasi medium 2 ml, 3 ml, 4 ml, dan 5 ml pada makro alga coklat *Sargassum* sp. untuk menghasilkan kolin lebih tinggi. Hasil menunjukkan hasil kadar rata-rata fosfatidilkolin pada masing-masing sampel kurang dari 4,3 mg per kg sampel. Penambahan medium PES (*Provasoli's Enriched Seawater*) dapat meningkatkan pertumbuhan alga. Peningkatan metabolisme lemak dan turunannya (fosfatidilkolin) dapat diproduksi dengan meningkatkan kondisi stres kelebihan nutrisi dari medium PES (*Provasoli's Enriched Seawater*).

Abstract

Choline is one of the chemical compound needed in pharmaceutical world as a component for drug and brain nutrition also for additional compound on milk. Choline activity can be used to develop brain and memory. In this era this compound is used in medical field to help parkinson, myasthenia gravis, and alzheimers patient. In Indonesia macroalgae (seaweed) is a potential resources that grows naturally at the sea shore are from genus Sargassum and Turbinaria. Sargassum spesies had an ability to produce choline and many other compounds. This study aims to look at the effect of medium Provasoli of Enriched Seawater (PES) with variation of 2, 3, 4, and 5 ml on the macro brown algae Sargassum sp. to produce a higher choline content. The average results fosfattidilkolin levels in each sample is less than 4,3 mg per kg sample with Thin Layer Chromatography - Densitometri. Additon of the medium PES (Provasoli's Enriched Seawater) can increase the growth of algae. The increased of fat metabolism and its derivatives (phosphatidylcholine) can be produced by the stress conditions of excess nutrients from the medium PES (Provasoli's Enriched Seawater).

I. LATAR BELAKANG

Garis pantai Indonesia mencapai sekitar 95.181 km yang ditumbuhi oleh beragam jenis rumput laut. Menurut Gupta & Abu-Ghannam (2011), menyatakan bahwa rumput laut dibagi menjadi 3 kelompok besar berdasarkan komposisi kimianya yaitu alga hijau (*Chlorophyta*), alga merah (*Rhodophyta*), dan alga coklat (*Phaeophyta*). Rumput laut mengandung banyak senyawa aktif dengan berbagai bioaktivitas sehingga memiliki potensi untuk dikembangkan (Kelman dkk, 2012). Di Indonesia rumput laut coklat sebagai sumberdaya potensial yang banyak tumbuh secara alami di perairan Indonesia adalah jenis *Sargassum* dan *Turbinaria* (Sinurat

dan Murdinah, 2007). *Sargassum* sp memiliki kemampuan dalam menghasilkan senyawa kolin dan beberapa senyawa aktif lainnya.

Kolin saat ini sangat dibutuhkan dalam dunia farmasetika sebagai bahan baku dalam pembuatan obat untuk nutrisi otak maupun bahan tambahan dalam pembuatan susu formula (Yende dkk, 2014; Zeisel dan Steven, 2012). Kolin dalam bahan pangan umumnya ditemukan dalam bentuk fosfatidilkolin (lesitin), seperti yang banyak ditemukan dalam susu, telur, hati, dan kacang tanah. Fosfatidilkolin mengandung kolin dengan persentase hingga 13% bobot per bobot kolin (Zeisel dan Steven, 2012). Senyawa kolin memiliki aktivitas yang dapat digunakan untuk membantu mengembangkan otak dan daya ingat (Zeisel dan Steven, 2012). Saat ini senyawa ini sedang banyak digunakan dalam bidang kedokteran untuk membantu penderita *alzheimer*, *parkinson*, dan *myasthenia gravis*.

Penyakit *alzheimer* merupakan penyakit gangguan neurodegeneratif progresif yang terjadi secara bertahap dimana penderita akan kehilangan memori, gangguan perilaku, perubahan kepribadian dan penurunan perilaku kognitif (Alzeimer, 1907). Penelitian mengenai gangguan syaraf menunjukkan terhambatnya fungsi kolinergik pada membran basal otak dan korteks pada penderita *alzheimer* (Davies dan Maloney, 1976). Strategi pengobatan *alzheimer* yang paling menjanjikan adalah secara terapeutik dengan mengaktifkan fungsi kolinergiknya kembali menggunakan agen kolinomimatik, seperti tacrine, donepezil, rivastigmine dan galantamine (Whitehouse dkk, 1982). Namun penggunaan obat sintetik seperti hepatotoxicity, gangguan gastrointestinal, dan beberapa masalah *bioavailability* dapat menyebabkan efek

samping (Schulz, 2003; Melzer, 1998). Dari efek samping penggunaan kolinesterase (ChEs) inhibitor sintetik tersebut, isolasi ChEs dari bahan alam telah menjadi sorotan yang menarik.

Oleh karena itu, penelitian ini akan dilihat pengaruh pemberian medium pada makro alga coklat *Sargassum* sp. terhadap jumlah kolin yang dihasilkan dengan penambahan medium *Provasoli of Enriched Seawater* (PES) untuk menghasilkan kolin lebih tinggi (Miyoshi dkk, 1968).

II. METODE

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian kali ini antara lain timbangan analitik, mikropipet, pro-pipet, akuarium percobaan, ember percobaan, gelas ukur, pipet ukur, erlemeyer, airator, kabel listrik, plastik (*trashbag*), gelas beker, pH-meter, kertas payung, kapas, termometer, alat pengukur salinitas refraktometer, alat pengukur oksigen terlarut sensodirect, autoclave STMN-Y222 OMRON, alat pengukur oksigen terlarut sensodirect, rotary evaporator RV06-ML KIKA WERKE. Bahan-bahan yang digunakan antara lain bibit alga *Sargassum* sp yang berasal dari Gunungkidul, Daerah Istimewa Yogyakarta, akuades, NaNO₃, Fe-EDTA, Tris (Tris Hidroksi Metil Aminometan), air destilasi, air laut, larutan MnSO₄, larutan H₂SO₄, larutan Na₂S₂O₃ 0,025 N, dan lain-lain.

Pembuatan Medium PES (James, 2012)

dH₂O disiapkan dan dimasukkan ke dalam erlemeyer sebanyak 250 ml. NaNO₃ ditimbang pada timbangan analitik dan dimasukkan ke dalam masing-masing

erlemeyer seberat 3,5 g. Erlemeyer masing-masing ditambahkan dengan Fe-EDTA seberat 0,1885 g dan Tris Buffer 52,25 g. Medium PES kemudian diaduk dengan sendok pengaduk kira-kira selama 30 detik. Medium disesuaikan pH-nya sekitar 7-7,8. Bila asam ditambahkan larutan KOH dan bila basa ditambahkan larutan HCl. Setelah itu, medium PES disterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Medium PES yang telah siap dimasukkan ke dalam aquarium yang telah berisi air laut steril sesuai dengan rancangan percobaan.

Uji Kualitas Air (Naid, 2013)

Uji kualitas air yang dilakukan antara lain pengukuran pH menggunakan alat pH-meter, pengukuran salinitas menggunakan refraktometer, pengukuran suhu menggunakan alat termometer, dan pengukuran oksigen terlarut (DO) menggunakan alat sensodirect. Uji kualitas air dilakukan pada hari ke-0, ke-7, ke-14, ke-21, dan ke-28.

Kultur Rumput Laut (Suniti dan Suada, 2012)

Akuarium sebanyak 5 buah diisi dengan air laut masing-masing 1.000 ml. Medium PES ditambahkan ke dalam masing-masing akuarium sesuai dengan rancangan percobaan. Benih dimasukkan ke dalam akuarium yang telah disiapkan sesuai dengan rancangan percobaan. Benih yang digunakan per akuarium dengan bobot 100 gram (Anggadiredja dkk, 2006). Pemanenan rumput laut dilakukan pada hari ke-7, hari ke-14, hari ke-21, dan hari ke-28 untuk dilanjutkan dengan penimbangan biomassa.

Pemisahan dan Pengukuran Senyawa Kolin (Yoon, 2008)

Sampel diektrak dan diukur kadar kolinnya di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gajah Mada (LPPT-UGM). Sampel diekstraksi menggunakan larutan etanol, kemudian di evaporasi didalam *waterbath*. Setelah itu sampel ditotolkan di plat silika, lalu fase diamkan didalam chamber yang telah berisi kloroform-metanol-asam asetat-air (65:15:10:4). Hasil KLT dapat dilihat dengan membandingkan tinggi puncak larutan standar dengan tinggi puncak sampel. Tinggi puncak larutan standard dan sampel akan diukur menggunakan alat densitometer.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Menurut Suniti dan Suada (2012), penambahan medium PES (*Provasoli's Enriched Seawater*) dapat meningkatkan pertumbuhan aggur laut *Caulerpa lentilifera*. Penambahan medium PES meningkatkan pertumbuhan anggur laut secara morfologi, yaitu mempercepat bertambahnya talus, mempercepat pertambahan panjang talus, mempercepat pertumbuhan stolon. Menurut Suniti dan Suada (2012), penambahan medium PES terbaik untuk pertumbuhan anggur laut *C. lentilifera* adalah 2 ml per 500 ml air.

Kolin merupakan senyawa turunan lemak (Zeisel dan Steven, 2012). Untuk meningkatkan kadar lemak dalam tubuh alga coklat dapat dilakukan dengan meningkatkan metabolisme pembentukan lemak. Proses metabolisme lemak dapat ditingkatkan pada kondisi kelebihan senyawa nitrogen, penyinaran yang baik (minimal 10.000 lux), penggantian medium secara berkala, dan peningkatan jumlah karbon dalam air atau medium (Muhlorth dkk., 2013).

Makroalga pada saat dikulturkan pertama kali sulit untuk ditumbuhkan. Sulitnya pertumbuhan makroalga dilihat pada saat kultur makroalga yang pertama dimana makroalga mati pada hari ketiga dan paling lama hidup selama 4 hari, sebelum dikarantina. Makroalga baru dapat hidup setelah percobaan kultur kelima dimana makroalga dapat tumbuh hingga 28 hari. Kultur kelima menggunakan air laut dan medium PES dua kali volume awal. Medium PES-1 awalnya menggunakan 500 ml air dengan penambahan 1 ml medium PES, setelah itu menjadi 1000 ml air laut ditambah 2 ml medium PES.

Kurangnya nutrisi yang diperlukan alga *Sargassum* sp. ataupun kondisi lingkungan medium kultur yang kurang optimal dapat memperlambat pertumbuhannya. Lingkungan medium kultur pada skala laboratorium yang berbeda dengan habitat asli alga *Sargassum* sp. juga memungkinkan terganggunya proses metabolisme kolin. Terganggunya proses metabolisme kolin dapat dilihat pada proses pertumbuhan alga selama di laboratorium. Sebelum dikarantina, alga sulit untuk ditumbuhkan dan hanya mampu hidup maksimal 4 hari. Pada hari kedua alga menunjukkan tanda talus yang menyerupai batang menjadi lunak dan mudah patah, serta sebagian talus yang menyerupai daun sudah lepas. Setelah dikarantina dan proses adaptasi alga mampu bertumbuh dan bertahan hidup. Meskipun tetap menunjukkan tanda talus menjadi lembek. Untuk melihat laju pertumbuhan makroalga dapat dilihat melalui berat makroalga setiap minggunya pada Tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata total berat pertumbuhan makroalga coklat *Sargassum* sp.

Medium	Total Berat Alga (gram)					Rata-Rata Pertambahan Berat
	Hari Ke-0	Hari Ke-7	Hari Ke-14	Hari Ke-21	Hari Ke-28	
PES 1	100	86	72	58	44	1 gram
PES 2	100	87	72	58	43	0,75 gram
PES 3	100	87	73	59	44	1 gram
PES 4	100	87	73	59	45	1,25 gram
Kontrol	101	87	73	59	44	0,75 gram

Tabel 2. Hasil pengukuran kadar fosfatidilkolin (mg/kg) berdasarkan hari kultur menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT).

No.	Perlakuan Sampel	Hari Pengukuran	Rata-rata Kadar Kolin
1.	Kontrol	Hari ke-0	<4,3
2.		Hari ke-7	<4,3
3.		Hari ke-14	<4,3
4.		Hari ke-21	<4,3
5.		Hari ke-28	<4,3
6.	PES 1	Hari ke-0	<4,3
7.		Hari ke-7	<4,3
8.		Hari ke-14	<4,3
9.		Hari ke-21	<4,3
10.		Hari ke-28	<4,3
11.	PES 2	Hari ke-0	<4,3
12.		Hari ke-7	<4,3
13.		Hari ke-14	<4,3
14.		Hari ke-21	<4,3
15.		Hari ke-28	<4,3
16.	PES 3	Hari ke-0	<4,3
17.		Hari ke-7	<4,3
18.		Hari ke-14	<4,3
19.		Hari ke-21	<4,3
20.		Hari ke-28	<4,3
21.	PES 4	Hari ke-0	<4,3
22.		Hari ke-7	<4,3

23.		Hari ke-14	<4,3
24.		Hari ke-21	<4,3
25.		Hari ke-28	<4,3

Setelah rumput laut ditumbuhkan di dalam medium kultur selama 28 hari, rumput laut kemudian dikeluarkan dari medium kultur untuk dikeringkan dan untuk dianalisis senyawa kolinnya. Menurut USDA (2004), menyebutkan bahwa kolin merupakan senyawa yang peka terhadap panas dan hamparan sinar matahari. Pengeringan kolin dapat dilakukan ditempat yang teduh, tetapi akan membutuhkan waktu sekitar 5-10 hari (Suniti dan Suada, 2012).

Menurut Chen dkk. (2012), kolin merupakan senyawa yang mudah larut dalam air dan mudah untuk diekstraksi dari makanan. Tetapi, kolin dari bahan alami seperti rumput laut dan telur sangat sulit untuk dianalisis berhubung dengan totalnya yang sangat kecil di dalam sampel seperti pada Tabel 2.

Dari hasil Tabel 2 dapat dilihat bahwa setiap sampel alga yang dikulturkan menunjukkan kadar fosfatidilkolin dalam sampel <4,3 mg/kg. Hasil tersebut berarti kadar fosfatidilkolin dalam sampel kurang dari baku standar (4,3 mg/kg) yang telah ditetapkan. Dalam penelitian ini terdapat beberapa kemungkinan tidak terdeteksinya fosfatidilkolin pada sampel, sebagai berikut:

1. Fosfatidilkolin tidak ada dalam alga.

Beberapa jenis makroalga coklat memang tidak memproduksi fosfatidilkolin sebagai senyawa metabolit, seperti pada jenis makroalga

Macrocytis, *Ascophylum*, *Dictyota*, *Padina* ataupun *Postelsia* (Yoon dkk. 2008).

2. Fosfatidilkolin mengalami bias pada saat analisis senyawa.

Hasil bias dalam analisis senyawa tertentu menggunakan metode tertentu dalam suatu sampel dapat saja terjadi. Pembiasan hasil dapat saja terjadi akibat reaksi-reaksi kimia yang terjadi selama proses analisis dilakukan. Penyebab hasil bias pada suatu sampel bisa saja terjadi akibat penyimpanan sampel makroalga yang tidak sesuai, ataupun akibat perubahan reaksi kimia selama proses presipitasi sampel. Kesalahan penyimpanan seperti penyimpanan sampel diruangan dengan suhu yang tidak sesuai ($>27^{\circ}\text{C}$) ataupun penyimpanan sampel yang terkena paparan sinar matahari berlebih. Beberapa perlakuan tersebut menimbulkan transformasi tertentu terhadap senyawa yang ada dalam sampel sehingga hasilnya bisa saja berkurang atau bias (Tahir, 2007).

3. Fosfatidilkolin tidak terdeteksi.

Senyawa dalam sampel bisa saja tidak dapat terdeteksi. Hal ini berkaitan dengan tingkat akurasi dan presisi dari proses presipitasi hingga instrumen yang digunakan untuk analisis sampel. Akurasi menunjukkan kedekatan nilai hasil pengukuran dengan nilai sebenarnya melalui perbandingan. Presisi menunjukkan tingkat *reliabilitas* dari data yang diperoleh berdasarkan standar deviansi dan bias (Tahir, 2007).

Pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 2 hasil pengukuran kadar fosfattidilkolin bahwa kadar yang dihasilkan pada masing-masing alga *Sargassum* sp. kurang dari 4,3 mg/kg. Dari hasil tersebut dapat diprediksi bahwa hasil mungkin saja mengalami bias dan tidak dapat ditentukan hasilnya. Fosfattidilkolin kolin bisa saja bias hasilnya dari perlakuan ekstraksi menggunakan etanol secara berulang (Chen, 2012). Selanjutnya menurut Chen (2012), proses pemanasan untuk memisahkan etanol selama pesipitasi bisa juga merusak senyawa yang akan dianalisis.

Menurut Kealey dan Haines (2002), KLT memiliki tingkat akurasi dan presisi lebih rendah jika dibandingkan dengan *Ion Chromatography*, *Gas Chromatography*, atau *High Performance Liquid Chromatography*. Dalam penelitian ini tingkat akurasi dan presisi KLT dapat dilihat dari nilai *Limit of Detection* (LOD) sebesar 4,3. Menurut Rohman (2009), nilai LOD menunjukkan batas minimal konsentrasi senyawa untuk dapat terdeteksi. Apabila senyawa yang akan dideteksi konsentrasinya berada dibawah nilai LOD yang ditetapkan, maka hasil biasa akan ditulis kurang dari (<) nilai LOD (Rohman, 2009).

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan diperoleh penambahan medium PES (*Provasoli's Enriched Seawater*) dapat meningkatkan pertumbuhan alga. Hasil kadar rata-rata fosfattidilkolin pada masing-masing sampel kurang dari 0,4% mg per kg sampel.

Penambahan nutrisi mikro seperti vitamin B12, thiamin, dan biotin, serta optimasi faktor lingkungan hidup perlu dilakukan untuk meningkatkan pertumbuhan alga *Sargassum* sp. Metode ekstraksi fosfatidilkolin pada saat analisis senyawa perlu dioptimasi untuk mengurangi jumlah fosfatidilkolin yang hilang akibat penggunaan etanol dan proses pemanasan yang berulang.

V. UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih diucapkan kepada Tuhan YME, Orang Tua penulis, Dekan Fakultas Teknobiologi UAJY, Dosen Pembimbing, Civitas Akademik, serta rekan-rekan yang mendukung keberhasilan penelitian

VI. DAFTAR PUSTAKA

- Brand, L. E., Sunda, W. G., and Guillard, R. R. L. 1986. *Reduction of Marine Phytoplankton Reproduction Rates by Copper and Cadmium. J. Exp. Marine Biol. Ecol.* 96:225–50.
- Gupta, S. dan Abu-Ghannam, N. 2011. Bioactive Potential and Possible Health Effects of Edible Brown Seaweeds. *Trends in Food Science and Technology*, 22: 315–326.
- Harrison, P. J. dan Berges, J. A. 2004. *Marine Culture Media: Algal Culturing Techniques*. National Institute Environmental Studies. Academic Press, America.
- James, D. E. 2012. *Culturing Algae Second Edition*. Caroline Biological Supply Company, USA.
- Kelman, D., Posner, E. K., McDermid, K. J., Tabandera, N. K., Wright, P. R., and Wright, A. D. 2012. Antioxidant Activity of Hawaiian Marine Algae. *Marine Drugs*. 10:403–416.
- Miyoshi, I., Paul, T., Borowski, dan Ashima, C. 1986. Choline and Inositol Distribution in Algae and Fungi. *Applied Microbiology* 12 : 620-623.
- Muggli, D. L., and Harrison, P. J. 1996. *EDTA Suppresses the Growth of Oceanic Phytoplankton from the Northeast Subarctic Pacific. J. Exp. Marine Biol. Ecol.* 205:221–7.

- Naid, T., Kasim, S. Marzuki, A., dan Sumarheni. 2013. Produksi Antibiotika Secara Fermentasi dari Biakan Mikroorganisme Simbion Rumput Laut *Euchema contonii*. *Majalah Farmasi dan Farmakologi*. Vol. 17: 61-69.
- Sinurat, E. dan Murdinah. 2007. Aplikasi Alginat sebagai Bahan Pengental Pada Pencapan Batik. *Jurnal Pasca Penen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. Vol. 2 : 32 – 40.
- Suniti, N. S. dan Suada, I. K. 2012. Kultur In-Vitro Anggur Laut (*Caulerpa lentilifera*) dan Identifikasi Jenis Mikrobial yang Berasosiasi. *Agrotop* 2 (1): 85-89.
- Yende, S. R., Harie, U. N., dan Chauqule, B. B. 2014. Therapeutic Potential and Health Benefits of Sargassum Species. *Pharmacogn Rev.* 8 (15):1-7.
- Yoon, N. Y., Kim, H. R., Choi, J. S., dan Chung, H. Y. 2008. Acetyl- and Butyrylcholinesterase Inhibitory Activities of Sterols and Phlorotannins from *Ecklonia stolonifera*. *Fisheries Science* 74: 200-207.
- Zeisel, S. H., dan Steven H. 2012. A Brief History of Choline. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 61 (3): 254-258.